

栀子柏皮汤 3 种方法提取液指标成分的比较

荆汉卫¹, 于定荣^{2*}

(1. 潍坊市食品药品检验检测中心, 山东 潍坊 220160; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**比较栀子柏皮汤 3 种方法(半仿生提取法、醇提取法、水提取法)提取液的成分,为栀子柏皮汤提取提供实验依据。**方法:**在饮片规格、溶剂用量、以及提取、滤过、浓缩设备相同的条件下,将栀子柏皮汤分别以半仿生提取法、醇提法、水提法 3 种方法提取,以 HPLC 测定 3 种方法提取液中主要有效成分栀子苷、盐酸小檗碱、甘草次酸含量;以紫外分光光度法测定总生物碱含量;将栀子苷、盐酸小檗碱、甘草次酸、总生物碱含量以及相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da 提取物得率共 5 个指标测定结果经标准化处理后进行加权求和,得综合评判值 Y 并进行比较, Y 大者为优。**结果:**栀子柏皮汤 3 种方法提取液的综合评判值 Y 大小顺序依次为:半仿生提取液 > 醇提液 > 水提液。**结论:**栀子柏皮汤 3 种提取方法中,以半仿生提取法最佳。

[关键词] 栀子柏皮汤; 半仿生提取; 多指标; 综合评判; 分子量 $\leq 1\ 000$ Da 提取物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0059-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220059

Comparative Analysis of Contents of Active Compositions from Zhizi Bopi Tang Extracted by Three Methods

JING Han-wei¹, YU Ding-rong^{2*}

(1. Weifang Center for Food and Drug Control, Weifang 220160, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the contents of the active compositions from Zhizi Bopi Tang extracted by three methods of semi-bionic extraction method (SBE method), alcohol extraction method (AE method), water extraction method (WE method) and provide experimental evidence for extracting Zhizi Bopi Tang. **Method:** Zhizi Bopi Tang was extracted by three methods of SBE method, AE method and WE method under the same conditions in the size of decoction pieces, amount of solvent, and the same extraction, filtration and concentration equipment. The contents of gardenoside, berberine and glycyrrhetic acid in the extracts under the above 3 methods were determined by HPLC method and the content of total alkaloids was determined by ultraviolet spectrophotometric method. The comprehensive evaluation value Y was based on the weighted sum of processed data of gardenoside content, berberine content, glycyrrhetic acid content, total alkaloids content and the extracts with molecular weight $\leq 1\ 000$ Da, the samples with larger Y value were better. **Result:** The order of the comprehensive evaluation Y of the three methods was as follows: SBE extracting solution > AE extracting solution > WE extracting solution. **Conclusion:** It can be concluded that SBE method was the best one among the three methods for Zhizi Bopi Tang.

[Key words] Zhizi Bopi Tang; semi-bionic extraction method; multi-component quantitation; comprehensive evaluation; molecular weight $\leq 1\ 000$ Da

栀子柏皮汤始载于汉代名医张仲景的《伤寒论》,由栀子、黄柏和炙甘草 3 味中药组成,其中栀

[收稿日期] 20151231(009)

[基金项目] 国家科技部国际合作项目(2007DFA31180)

[第一作者] 荆汉卫, 硕士, 主管药师, 从事中药制剂质量控制研究, Tel:15165610516, E-mail:jinghanwei2008@126.com

[通讯作者] * 于定荣, 博士, 助理研究员, 从事中药制剂与炮制研究, Tel:010-84018690, E-mail:yudingrong0826@sina.com

子苷是梔子的主要有效成分,具有镇痛和抗炎作用^[1],亦为《中国药典》中规定的梔子质量控制指标^[2];生物碱类为关黄柏中的主要药效成分,具有抗炎、抑菌作用^[3-4];甘草的药效成分有甘草素、甘草黄酮等黄酮类成分以及甘草酸、甘草次酸等三萜类成分,具有保肝利胆作用^[5],方中 3 味中药共同发挥疗效,用于治疗湿热发黄、热重于湿之阳黄证^[6]。

已有梔子柏皮汤提取方法的报道主要为煎煮法^[7]。为了优选梔子柏皮汤提取方法,本实验在优选出半仿生提取法工艺条件的基础上^[8],在饮片规格、溶剂用量、以及提取设备、滤过设备相同的条件下,以方中各药的主要药效成分梔子苷、盐酸小檗碱、甘草次酸、总生物碱以及相对分子量 $\leq 1\ 000$ Da 提取物为指标,对梔子柏皮汤半仿生提取液(SBE 液),醇提液(AE 液),水提液(WE 液)3 种提取液进行比较,以多指标进行综合评判确定其最佳提取方式,为梔子柏皮汤的提取工艺提供依据。

1 材料

PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂),MA110 型电子分析天平(上海第二分析仪器厂),1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),UV3010 型紫外分析仪(日立公司),DH-系列中空纤维超滤膜(上海德宏生物医学科技发展有限公司)。

梔子饮片(批号 147987),关黄柏饮片(批号 149266),甘草饮片(批号 109223)均购自山东博康中药饮片有限公司,经山东中医药大学张兆旺教授鉴定,性状均符合《中国药典》2015 年版梔子、关黄柏、甘草各项下的规定。

对照品:梔子苷(批号 110749-201216),盐酸小檗碱(批号 110713-201212),甘草次酸(批号 110723-201214)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 半仿生提取液(SBE 液)按处方比例称取各药材饮片粗粉(10~20 目),以 SBE 法提取(关黄柏单煎,梔子、甘草合煎),3 煎用水 pH 依次为 2.0,7.5,8.5;提取时间依次为 2,1,1 h^[8]。分别将 3 煎提取液依次粗滤、离心(3 500 r·min⁻¹)25 min,经一定规格的中空纤维膜滤过,合并,浓缩,定容至 100 mL,得相对分子量 $\leq 1\ 000$ Da 的 SBE 供试液。

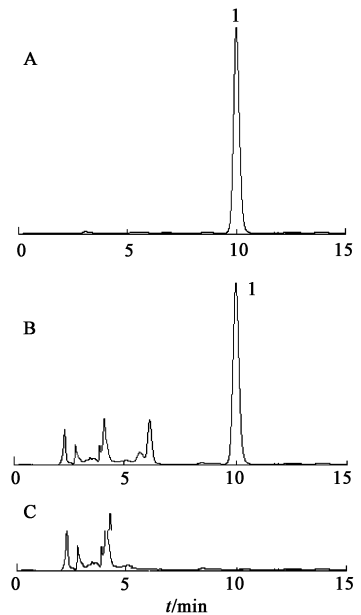
2.2 AE 液,WE 液按 2.1 项下方法,将溶剂分别改为 80%乙醇和中性水,其余同法操作,分别制备

得相对分子量 $\leq 1\ 000$ Da 的 AE,WE 供试液。

2.3 对照品溶液制备分别精密称取梔子苷对照品 2.86 mg,盐酸小檗碱对照品 1.94 mg,甘草次酸对照品 2.38 mg,加甲醇溶解定容至 10 mL,即得对照品溶液 I,II,III;另精密称取盐酸小檗碱对照品 5.30 mg,用 pH 7.0 的缓冲液(取磷酸二氢钾 0.68 g,加 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 29.1 mL,用水稀释至 100 mL,即得)定容至 50 mL,即得对照液 IV。

2.4 梔子苷含量测定^[9]

2.4.1 色谱条件 Diamonsil^(TM) 钻石 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(15:85),检测波长 238 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,柱温 30 ℃,结果见图 1。



A. 对照品;B. 样品;C. 缺梔子阴性;1. 梔子苷

图 1 梔子柏皮汤 HPLC(梔子苷)

Fig. 1 HPLC chromatography of Zhizi Bopi Tang(gardenoside)

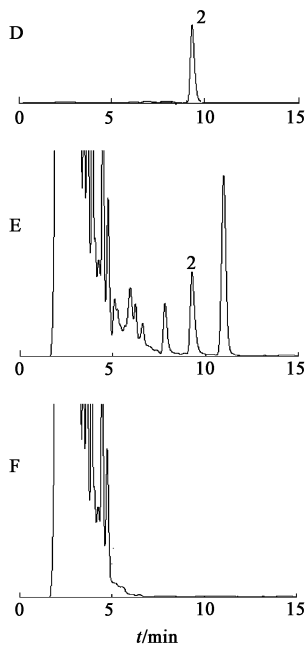
2.4.2 线性关系考察精密吸取对照品溶液 I 1,5,10,16,20,30 μL,按 2.4.1 项下色谱条件进样,以进样量(μg)对峰面积进行线性回归,得梔子苷回归方程为 $Y = 1\ 406.9X - 56.768$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明,梔子苷在 0.286~8.58 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.3 含量测定精密吸取 2.1,2.2 项下 SBE,AE,WE 供试品溶液各 10 μL,按照 2.4.1 项下色谱条件进样,计算,结果梔子苷质量分数分别为 13.438,14.542,16.292 mg·g⁻¹。

2.5 盐酸小檗碱含量测定^[10]

2.5.1 色谱条件 Diamonsil^(TM) 钻石 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹

$L^{-1}KH_2PO_4$ (35 : 65), 检测波长 265 nm, 流速 1.0 $mL \cdot min^{-1}$, 进样量 20 μL , 柱温 20 $^{\circ}C$, 结果见图 2。



D. 对照品; E. 样品; F. 缺黄柏阴性; 2. 盐酸小檗碱

图 2 栀子柏皮汤 HPLC (盐酸小檗碱)

Fig. 2 HPLC chromatography of zhizi Bopi Tang (berberine)

2.5.2 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 II 2, 8, 14, 20, 24, 30 μL , 按 2.5.1 项下色谱条件进样, 以进样量 (μg) 对峰面积进行线性回归, 得盐酸小檗回归方程为 $Y = 475.24X + 8.3959$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 盐酸小檗碱在 0.388 ~ 5.82 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

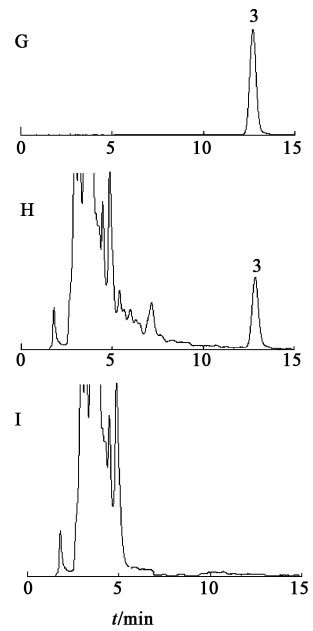
2.5.3 含量测定 精密吸取 2.1, 2.2 项下 SBE, AE, WE 供试品溶液各 20 μL , 按照 2.5.1 项下色谱条件进样, 计算盐酸小檗碱质量分数分别为 1.280, 1.195, 0.511 $mg \cdot g^{-1}$ 。

2.6 甘草次酸含量测定^[11]

2.6.1 色谱条件 Diamonsil^(TM) 钻石 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸 (87 : 13), 检测波长 250 nm, 流速 1.0 $mL \cdot min^{-1}$, 进样量 20 μL , 柱温 25 $^{\circ}C$, 结果见图 3。

2.6.2 线性关系考察 精密吸取对照溶液 III 2, 4, 6, 8, 10, 14 μL 按 2.6.1 项下色谱条件进样, 以甘草次酸的含量 (μg) 对峰面积进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 1812.6X + 32.759$ ($r = 0.9998$), 表明甘草次酸在 0.476 ~ 3.332 μg 线性良好。

2.6.3 含量测定 精密吸取 2.1, 2.2 项下 SBE, AE, WE 供试液各 20 μL , 按照 2.6.1 项下色谱条件进样, 计算甘草次酸质量分数分别为 0.099, 0.085,



G. 对照品; H. 样品; I. 缺甘草阴性; 3. 甘草次酸

图 3 栀子柏皮汤 HPLC (甘草次酸)

Fig. 3 HPLC chromatography of Zhizi Bopi Tang (glycyrrhetic acid)

0.063 $mg \cdot g^{-1}$ 。

2.7 总生物碱含量测定^[12]

2.7.1 线性关系考察 精密吸取 2.3 项下对照品溶液 IV 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL, 分别置具塞锥形瓶中, 蒸干溶剂, 用 pH 7.0 的缓冲溶液稀释至 2.0 mL。精密加入 0.007% 溴麝香草酚蓝 8.0 mL, 充分摇匀, 再精密加入三氯甲烷 10.0 mL, 反复振摇 2 min 后移入分液漏斗, 静置。分取三氯甲烷层, 用干燥滤纸滤过, 滤液以相应的试剂为空白, 在 413 nm 测定吸光度, 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程 $Y = 12.075X - 0.003$ ($r = 0.9998$), 表明该条件下, 总生物碱在 0.0212 ~ 0.0636 $mg \cdot L^{-1}$ 浓度与吸光度线性关系良好。

2.7.2 总生物碱含量测定 分别精密吸取 2.1, 2.2 项下 SBE, AE, WE 供试品溶液各 0.5 mL, 按照 2.7.1 项下方法, 测定吸光度, 计算, 结果总生物碱质量分数分别为 10.890, 8.822, 3.641 $mg \cdot g^{-1}$ 。

2.8 相对分子质量 ≤ 1000 Da 提取物得率测定 精密吸取 2.1, 2.2 项下 SBE, AE, WE 供试品溶液各 10 mL, 置于干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸至近干, 于 105 $^{\circ}C$ 烘至恒重, 计算相对分子质量 ≤ 1000 Da 提取物得率分别为 0.264, 0.260, 0.210 $g \cdot g^{-1}$ 。

2.9 数据处理 以栀子苷、盐酸小檗碱、甘草次酸、总生物碱、相对分子质量 ≤ 1000 Da 提取物得率为指标, 按公式进行标准化处理 $x'_{i,j} = (x_{i,j} - \bar{x}_j) / s_j$, 式

中 x'_{ij} 是标准化后得值, x_{ij} 为供试液 i 中成分 j 的含量, \bar{x}_j 为各种供试液 i 中成分 j 的平均值, s_j 为成分 j 的标准偏差。根据各指标在工艺选择中的主次, 给予不同的加权系数, 即得综合评价指标 Y 值, $Y =$

$[(\text{栀子苷} + \text{小檗碱} + \text{甘草次酸}) \div 3] \times 7 + \text{总生物碱} \times 2 + \text{相对分子质量} \leq 1\ 000\ \text{Da} \times 1$ 。栀子柏皮汤方药 3 种方法提取液综合评判结果依次为 $\text{SBE} > \text{AE} > \text{WE}$, 见表 1。

表 1 各指标得率及标准化处理

Table 1 Results of yield of five indexes and standardization

供试品	栀子苷 /mg·g ⁻¹	盐酸小檗碱 /mg·g ⁻¹	甘草次酸 /mg·g ⁻¹	总生物碱 /mg·g ⁻¹	≤1 000Da 提取物 /g·g ⁻¹	Y 值
SBE 液	13.438 (-0.917)	1.280 (0.675)	0.099 (0.944)	10.89 (0.921)	0.264 (0.633)	4.115
AE 液	14.542 (-0.149)	1.195 (0.474)	0.085 (0.167)	8.822 (0.308)	0.260 (0.500)	2.261
WE 液	16.292 (1.067)	0.511 (-1.147)	0.063 (-1.056)	3.641 (-1.228)	0.210 (-1.167)	-6.273

注: 表格中括号中为标准化处理后数值。

3 讨论

中药半仿生提取法是根据中药和方剂中部分成分已知, 大部分成分未知的现实, 利用灰思维方式创立的中药提取新技术。在提取工艺的设计中坚持“有成分论, 不唯成分论, 重在机体药效学反应的”观点。以一种或几种有效成分、总浸出物及不同极性部分等做指标和(或)主要药理作用做指标, 综合评判, 优选提取工艺, 不拘泥于某化学成分或适合纯化学成分的药理模型, 而是考虑到综合成分的作用。在栀子柏皮汤方药中, 栀子苷是栀子的主要有效成分, 生物碱类是关黄柏中的主要药效成分, 甘草素、甘草黄酮等黄酮类成分以及甘草酸、甘草次酸等三萜类成分为甘草的药效成分。在本研究中, 基于栀子柏皮汤复方中指标成分较多的情况, 选择其主要药效成分栀子苷、盐酸小檗碱、甘草次酸、总生物碱、以及相对分子质量 ≤ 1 000 Da 提取物得率为指标, 按照其在提取工艺选择中的主次地位, 给予不同的加权系数, 经标准化处理, 经综合评判, 结果栀子柏皮汤 3 种方法提取液综合评判 Y 值的大小顺序依次为 $\text{YSBE} > \text{YAE} > \text{YWE}$, 说明栀子柏皮汤方药药效物质的提取以 SBE 法为佳。这种以多指标评判提取工艺, 比采用单指标或者单一成分进行评判更加合理, 客观, 科学。该研究为栀子柏皮汤的提取工艺提供了一定的科学依据。由于半仿生提取法模拟口服给药及药物经胃肠道转运的过程, 依据正交试验法或均匀设计法、比例分割法, 优选最佳条件, 并加以搅拌设备, 在提取过程中采用高温煎煮, 存在易破坏有效成分的缺点; 此外, 半仿生提取在体外已进行了酸、碱水解, 故对于栀子柏皮汤复方制备的口服制剂, 可能存在水解过度问题; 在提取过程中对单味药

栀子、黄柏和炙甘草的某些化学成分也可能产生一定的影响, 这些问题尚需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 方尚玲, 刘源才, 张庆华, 等. 栀子苷镇痛和抗炎作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1374-1376.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 248.

[3] 赵鲁青, 曾瑞祥, 王森民, 等. 复方黄柏冷敷剂的药理学研究[J]. 中国药事, 1995, 9(4): 236-238.

[4] 南云生, 毕晨蕾. 炮制对黄柏部分药理作用的影响[J]. 中药材, 1995, 18(2): 81-84.

[5] 宋光明, 吴连秋, 万宗明, 等. 甘草浸膏利胆作用的研究[J]. 武警医学院学报, 2001, 10(4): 267-268.

[6] 苗润田. 伤寒论教程[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 167.

[7] 肖旭, 朱继孝, 罗光明, 等. 栀子柏皮汤对小鼠急性肝损伤的保护作用及对大鼠的利胆作用研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 2998-3000.

[8] 荆汉卫, 孙秀梅, 张兆旺, 等. 用均匀设计优选栀子柏皮汤半仿生法提取的工艺条件[J]. 天津中医药, 2011, 28(2): 154-157.

[9] 孟宪波. HPLC 测定莲栀清火胶囊中栀子苷、穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 155-157.

[10] 叶秀金, 宋粉云. HPLC 测定清肺抑火丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 90-92.

[11] 吉艳彬, 孙瑶, 王春华, 等. HPLC 法检测甘草中甘草次酸的含量[J]. 山东化工, 2013, 42(10): 68-70.

[12] 张学兰, 张兆旺, 徐霞, 等. 黄柏 SBE 法与 WE 法的成分比较[J]. 中国中药杂志, 1999, 20(20): 600-602.

[责任编辑 顾雪竹]